

## ヒト好塩基球性白血球細胞KU-812-Fにおけるヒスチジン脱炭酸酵素 : 誘導, 精製, cDNAクローニング)

著者	佐藤 るり子
号	2296
発行年	1991
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/20555">http://hdl.handle.net/10097/20555</a>

氏 名 (本籍) 佐 藤 る り 子

学 位 の 種 類                      医                      学                      博                      士

学 位 記 番 号                      医                      第    2 2 9 6    号

学位授与年月日 平成 3 年 2 月 27 日

学位授与の条件 学位規則第5条第2項該当

最 終 学 歴 昭 和 58 年 3 月 25 日  
東北大学医学部医学科卒業

学位論文題目 HISTIDINE DECARBOXYLASE IN HUMAN  
BASOPHILIC LEUKEMIA (KU-812-F) CELLS :  
Induction, purification and cDNA cloning.  
(ヒト好塩基球性白血病細胞KU-812-Fにおける  
ヒスチジン脱炭酸酵素：誘導, 精製, cDNAクロー  
ニング)

(主 査)

論文審査委員 教授 滝 島 任 教授 本 宮 雅 吉

教授 岡 本 宏

## 論文内容要旨

ヒスタミンは、アレルギー反応、気道収縮、vasomotor制御、そして神経伝達において重要な役割を果たしている。ヒスチジン脱炭酸酵素（HDC）は、ヒスチジンからヒスタミンを合成する酵素であるが、好塩基球や肥満細胞、脳、胃、胎児肝などの組織に存在する。従来HDCについての研究は殆んどrodentの系でなされており、ヒトの組織、特に白血球でのHDCについてはあまり知られていない。一方、新潟大・岸らが樹立したヒト白血病細胞KU-812-Fは無血清の培養条件下で好塩基球様細胞に分化することが知られている。我々は、KU-812-F細胞にHDC活性が存在する事を確かめ、活性誘導を検討し、更に部分精製、cDNAクローニングを試みたので報告する。

### 【方 法】

(1)細胞培養；KU-812-F細胞は、無血清培地Hy-Medium 606で培養した。好塩基球様細胞はAlcian-Blue染色にて同定した。

(2)HDC活性測定；細胞はHDC solution (0.1M potassium phosphate buffer, pH6.8, 0.2 mM dithiothreitol, 0.01mM pyridoxal 5'-phosphate, 1 % polyethylene glycol, 100  $\mu$ g/ml phenylmethane sulfonylfluoride, 0.1mM EGTA) に浮遊させ、sonicationし破碎後12,000g 20分遠心し、上清を酵素液として用いた。これをHDC solutionに対して透析した後、0.25mM のヒスチジンを添加し37°Cでincubateし、perchloric acidを加えて反応停止し遠心上清のヒスタミンをHPLC蛍光法にて測定し、HDC活性とした。

(3)部分精製；KU-812-Fを2 %血清を添加したRPMI 1640にて培養し70 lの細胞浮遊液を得た。集めた細胞にHDC solutionを加え、sonicationで蛋白を抽出し、これを5段階のchromatographyにapplyし、精製を行った。まずA) DE52 cellulose columnにapplyし、10mM～200 mM potassium phosphate HDC solutionのlinear gradientで溶出した。active fractionを集め、濃縮、透析後B) Mono Q superoseにapplyし、A)と同じsolutionで溶出した。active fractionを濃縮、透析後、C) Phenyl superoseにapplyし、0.5M ammonium sulfateを含む20mM potassium phosphate HDC solutionと、20mM potassium phosphate HDC solutionで溶出した。更にactive fractionをD) Mono Q superoseにapplyした後、最後にE) Superose 6 & 12にapplyしHDC solutionで溶出した。

(4)cDNAクローニング；KU-812-F細胞よりguanidine-thiocyanate法により、RNAを抽出し、Okayama-Berg cDNA Cloning/Expression Vectorを用いてcDNAライブラリーを作製した。

これをJosephらにより報告されたラットのHDC塩基配列(547-596, 970-1019)を基に合成したprobeを用いてscreeningした。単離したcDNAをカルシウム沈澱法にてCOS細胞に導入し、48時間後細胞内HDC活性を測定した。

## 【結 果】

(1)活性誘導；無血清の条件下で、KU-812-F細胞のAlcian-Blue陽性細胞は3～93%で、HDC活性は無刺激で10～57pmol/min/mg proteinの範囲で検出され、Alcian-Blue陽性率と活性は相関関係があった。又、HDCの特異的阻害剤 $\alpha$ -fluoromethyl histidineで阻害されるが、芳香族アミノ酸脱炭酸酵素の特異的阻害剤carbidopaでは阻害が著しく弱いこと、ならびにヒスチジンに対するKm値(0.27mM)より本活性がHDCである事が確められた。一方、培養上清中にphorbol myristate acetate (PMA)を添加すると、50nMの濃度で4hrをpeakとするHDC活性の誘導が認められた。この誘導は、protein kinase Cの阻害剤staurosporine、及び蛋白合成阻害剤cycloheximide添加にて抑制された。

(2)部分精製；HDC活性上昇のメカニズムについて更に検討を加える為、細胞の大量(70 l)培養を行い精製を試みた所、粗酵素液より比活性で350倍(23.7nmol/min/mg protein)の精製標品を得、回収率は0.7%であった。この標品をポリアクリルアミド電気泳動にかけ銀染色をした所 Mr 110kDaの部位にbandがあり、この部分に活性が検出された。これをSDSポリアクリルアミド電気泳動にかけた所Mr 50-70kDaの部位に4本のbandが検出され純度は10～20%であった。

(3)cDNAクローニング；単離したcDNAクローンの1つ、pTN-2は約2.4k base pairのinsertを有しており、これをCOS細胞に導入した所、KU-812-F細胞に匹敵する程のHDC活性が検出され、pTN-2が機能的なHDCをencodeしている事が確められた。Sangerらのdideoxy法によりcDNAの塩基配列を決定した所、ヒトHDCは662のアミノ酸よりなり、分子量74,178であった。ラット及びマウスのアミノ酸配列と比較した所85%のhomologyがあった。PMAで刺激後のKU-812-F細胞のRNAをヒトHDC cDNA probeを用いNorthern analysisを行った所、無刺激でも2種のHDC mRNAを発現しており、経時的変化はなく、活性の誘導がtranslationのレベルでおこることが示唆された。

## 審 査 結 果 の 要 旨

ヒスタミンは、アレルギー反応、気道収縮、vasomotor制御、そして神経伝達において、重要な役割を果たしている。ヒスチジン脱炭酸酵素（HDC）は、ヒスチジンからヒスタミンを合成する酵素であるが、好塩基球や肥満細胞、脳、胃、胎児肝などの組織に存在する。従来HDCについての研究は殆んどrodentの系でなされており、ヒトの組織、特に白血球でのHDCについてはあまり知られていない。一方、新潟大・岸らが樹立したヒト白血病細胞KU-812-Fは無血清の培養条件下で好塩基球様細胞に分化することが知られている。本論文では、KU-812-F細胞にHDC活性が存在する事を確かめ、活性の誘導を検討し、更に部分精製及びcDNAクローニングについて報告している。

得られた結果についてまとめてみると、無血清の条件下では本細胞のAlcian-Blue陽性率は3～93%で活性は10～57pmol/min/mg proteinの範囲で検出され、陽性率と活性は相関関係があった。培養上清中にphorbol myristate acetate（PMA）を添加すると4hrをpeakとするHDC活性の誘導が認められた。この誘導はprotein kinase Cの阻害剤staurosporin及び蛋白合成阻害剤cycloheximide添加にて抑制された。

次に細胞の大量培養（70 l）を行い精製を試みた所、比活性で350倍（23.7 nmol/min/mg protein）の精製標品を得、回収率は0.7%であった。この標品をポリアクリルアミド電気泳動にかけ銀染色をした所Mr 110kDaの部位にbandがあり、この部位に活性が検出された。これをSDSポリアクリルアミド電気泳動にかけ銀染色をした所Mr 50-70kDaの部位に4本のbandが検出され、純度は10-20%であった。

cDNAクローニングは、KU-812-FよりcDNAライブラリーを作製し、これをラットの塩基配列を基に合成したprobeを用いてscreeningした。単離したクローンの1つpTN-2は、2.4K base pairのinsertを有し、これをCOS細胞に導入した所、HDC活性が検出され、機能的なHDCをencodeしている事が確かめられた。

Sangerらのdideoxy法によりcDNAの塩基配列を決定した所ヒトHDCは662のアミノ酸よりなり、分子量74,178であった。ラット及びマウスのアミノ酸配列と比較した所85%のhomologyがあった。

PMAで刺激後のKU-812-F細胞のRNAをヒトHDC cDNA probeを用いNorthern analysisを行った所、無刺激でも2種のHDC mRNAを発現しており、経時的变化はなく、活性の誘導がtranslationのレベルでおこることが示唆された。

正常ヒト組織や白血球についてのHDC活性の測定や精製は、材料が得にくく困難であるが、本実験ではKU-812-Fというcell lineを好塩基球のモデルとして用いて活性の誘導や精製、及びcDNAクローニングの成功に導いている。特にcDNAクローニングはヒトHDCについては最初の仕事である。

以上のことから本論文は学位に値いすると考える。